Caldasia 17 (1): 87-94, 1992

ESPECIALIZACIONES DEL TEGUMENTO DE INCUBACION DE LA HEMBRA DE *CRYPTOBATRACHUS BOULENGERI* (AMPHIBIA: ANURA: HYLIDAE)

Gloria R. De Pérez
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Centro de Microscopía Optica y Electrónica, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.

Pedro M. Ruiz-Carranza
Laboratorio de Anfibios, Instituto de Ciencias Naturales-Museo de Historia Natural, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.

M. Patricia Ramirez-Pinilla
A.A. 078263, Santafé de Bogotá.

Resumen

Se observan modificaciones histológicas y citológicas en el tegumento incubador de *Cryptobatrachus boulengeri* relacionadas con la incubación de los huevos sobre el dorso de la hembra, en comparación con la piel de machos y hembras adultos. La epidermis y la dermis tienen un espesor significativamente mayor lo que otorga una apariencia esponjosa al tegumento. Los dos tipos de glándulas mucosas son activas y secretan glicoproteínas ácidas. La secreción de las glándulas mucosas G2 es holocrina en hembras con huevos dorsales en los primeros estados de desarrollo. Hay dos mecanismos para la adhesión firme de la masa de huevos al dorso de la hembra: mecánico, relacionado con el anclaje de la envoltura de los huevos dentro de invaginaciones microscópicas epiteliales dispersas en todo el tegumento materno, y químico, por las secreciones pegajosas de las glándulas, especialmente de las glándulas G2.

Abstract

Histological and cytological modifications related to the incubation of the eggs on the dorsum of the female are observed in the incubatory tegument as compared with the skin of adult males and females of *Cryptobatrachus boulengeri.* The epidermis and dermis are significantly thicker and have a spongy appearance. The two types of mucous glands are active and secrete acid glycoproteins. The secretion of the G2 mucous glands is holocrine as observed in females with dorsal eggs in the first developmental stages. There are two mechanisms for the firm sticking of the egg mass to the frog's back: mechanical, related to the anchorage of the envelope of eggs into the microscopic epithelial infoldings scattered throughout the maternal tegument, and chemical, by the sticky secretions of mucous glands, especially of the G2 glands.

Introducción

El estudio de la biología de los anfibios y un mayor conocimiento de las estrategias reproductivas han mostrado que en este grupo existen modalidades de cuidado parental en especies que ponen pequeños grupos de huevos, tienen períodos de crianza prolongados y reproducción terrestre. En los anura el cuidado parental móvil implica el transporte de huevos y/o larvas, puede ser realizado por las hembras o los machos y se asocia a huevos terrestres, salvo en los pípidos acuáticos (Duellman, 1985).

En los hílidos, especies de seis géneros de la subfamilia Hemiphractinae exhiben cuidado parental móvil que involucra al tegumento de las ranas hembras: en tres de los géneros (*Stefania, Cryptobatrachus* y *Hemiphractus*) los huevos se adhieren al dorso de la madre donde se desarrollan y eclosionan como ranas juveniles. En los otros géneros (*Flectonotus, Fritziana, Gastrotheca*) el tegumento forma bolsas de incubación en la región dorsal (Del Pino, 1989).

En las especies de *Hemiphractus, Cryptobatrachus, Stefania* y en algunas de *Gastrotheca* el desarrollo es directo. Los embriones de las especies de la subfamilia tienen grandes branquias externas acampanuladas, carácter por el cual se le considera un grupo monofilético (Duellman y Gray, 1983).

Del Pino (1980) establece seis tipos estructurales de bolsas incubadoras en las ranas marsupiales, y en las especies que carecen de ella describe las características histológicas del tegumento dorsal de hembras en períodos no reproductivos y durante la incubación. Según esta autora en estas últimas especies, la gelatina de los huevos se adhiere fuertemente a la piel del dorso de la hembra mediante una matriz gelatinosa secretada por las glándulas mucosas del tegumento dorsal materno.

Al respecto, De Pérez & Ruiz-C. (1985) describen en hembras sexualmente adultas de *Cryptobatrachus* sin embriones en el dorso, pero con ovarios bien desarrollados, un tipo de glándulas mucosas histologicamente diferentes de las glándulas mucosas típicas de los anuros que posiblemente contribuyen con sus secreciones a la adhesión de los huevos y embriones en desarrollo al dorso de la hembra. Se realiza en este trabajo el estudio histológico de la asociación huevo y/o embrión-tegumento materno, así como de los cambios en las características citológicas de las células epiteliales de la epidermis de la hembra incubadora con respecto a la de machos y hembras adultos.

Materiales y métodos

Se procesaron 10 ejemplares de *Cryptobatrachus boulengeri* adultos procedentes del Municipio de Sasaima, Departamento de Cundinamarca, Colombia, así: cinco machos adultos (ICN 14801-14803, 14811, 14813), dos hembras adultas no incubadoras (ICN 14812, 14834) y tres hembras adultas con embriones sobre el dorso (ICN 14814-14816), dos de ellas con huevos en los primeros estadios de desarrollo y una con embriones más avanzados. De las hembras con cría en el dorso se extrajeron cuidadosamente los huevos a través de una pequeña incisión en la parte superior de la envoltura dejando intacta el área de adhesión de ésta a la piel de la hembra. Segmentos de piel-envoltura del embrión, y de piel medio dorsal de machos y hembras sexualmente adultos, se procesaron de acuerdo con la metodología descrita en De Pérez & Ruiz-C. (1985).

Con el fin de determinar posibles modificaciones morfométricas en estructuras de la piel en las hembras portadoras, en todos los ejemplares se tomaron medidas del espesor de la epidermis, del tejido esponjoso y de la dermis compacta; en secciones con glándulas mucosas a nivel del canal, se midieron el diámetro de las glándulas mucosas y la altura del epitelio secretor. Las medidas se realizaron en un microscopio Amplival Pol-U provisto de aditamento micrométrico. Se utilizó el test de student para establecer la significancia de las diferencias observadas en los datos morfométricos de los especímenes.

Resultados

La piel de los machos y hembras de *Cryptobatrachus boulengeri* sexualmente adultos tiene la estructura histológica característica del tegumento de los Anura y es descrita en detalle por De Pérez & Ruiz-C. (1985).

En hembras incubadoras se observan variaciones significativas en el espesor de la epidermis ($t = 23.92$, $p = 0.0001$) el estrato esponjoso ($t = 17.7$, $p = 0.001$) y el estrato compacto ($t = 43.3$, $p = 0.001$) cuando se compara con el espesor de los mismos estratos en machos y hembras adultos (Fig. 1).

En embriones en las primeras etapas de desarrollo, la epidermis materna presenta invaginaciones en el epitelio en forma de espina o pliegues en los que penetra la envoltura de los embriones (Fig. 2).

En la epidermis de las dos hembras con embriones en los primeros estadios de desarrollo se observan 2 a 3 capas córneas y en la epidermis de la hembra con embriones en estadios de desarrollo más avanzados se encuentran 20 a 22

ICN = Número asignado dentro de la colección batracológica del Instituto de Ciencias Naturales-Museo de Historia Natural, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.

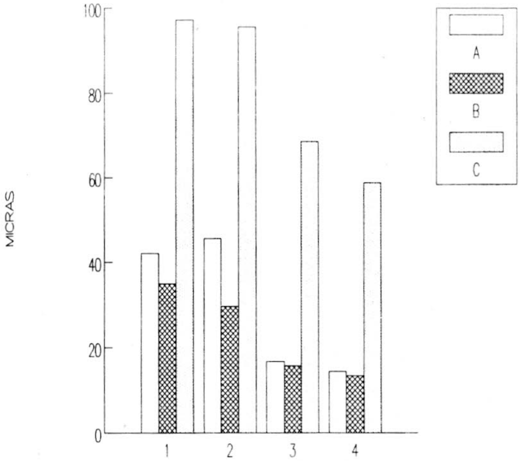


Figura 1. Espesor en micras de los estratos del tegumento de *Cryptobatrachus boulengeri*, 1. hembras incubadoras con embriones en los primeros estados de desarrollo, 2. hembra incubadora en estados más avanzados 3. hembras adultas no incubadoras, 4. machos. A. epidermis, B. estrato esponjoso, C. estrato compacto. Véase en el texto el grado de significancia de las variaciones. Grado de reducción del tamaño original de la figura 40%.

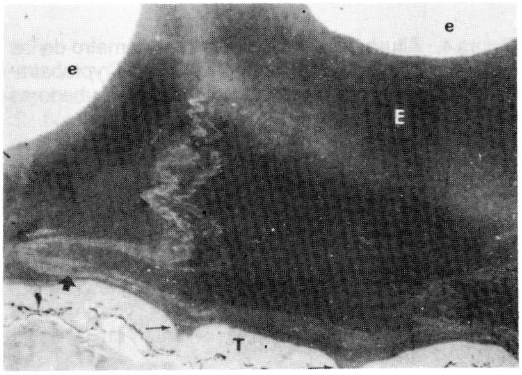


Figura 2. Región del tegumento incubador (T). Se observan pliegues epidérmicos (flechas delgadas) penetrados por la envoltura de los embriones (E). Nótese las fibras de la envoltura paralelas y perpendiculares (flechas anchas) a la superficie del tegumento materno y dos compartimientos parciales de los embriones (e) separados por un septo de la envoltura. 160x. Grado de reducción del tamaño original de la figura 56.6%.

capas celulares de las cuales 15 corresponden al estrato córneo (Fig. 3). Así, el número de capas córneas aumenta en el tegumento de hembras con embriones más desarrollados. La epidermis comprendida entre el estrato germinativo y el granuloso está conformada por 6 a 7 capas de células, que muestran hipertrofia con respecto a las de machos y hembras adultos sin cría.

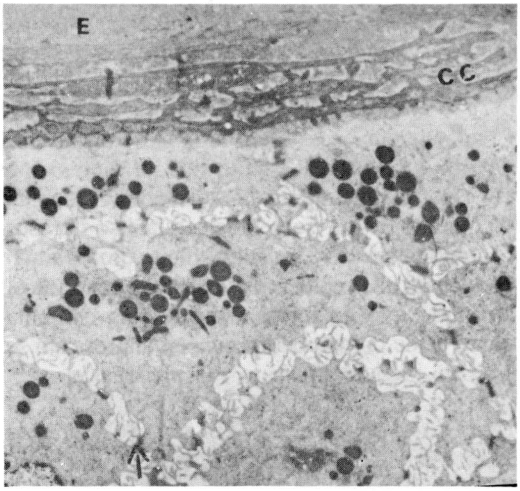


Figura 3. Electromicrografía de la epidermis de una hembra incubadora con embriones en los primeros estados de desarrollo que muestra la abundancia de gránulos de secreción en los estratos espinoso, granuloso y de reemplazo. Obsérvese la amplitud de los espacios intersticiales y las membranas celulares altamente plegadas unidas por pequeños desmosomas, las capas córneas (CC) y parte de la envoltura de los huevos (E). 6000x. Grado de reducción del tamaño original de la figura 56.6%.

Los espacios intersticiales entre las células epiteliales son más amplios. En células de los estratos espinoso y granuloso y de reemplazo se concentran abundantes gránulos de diferentes tamaños PAS y azul de alcian positivos.

Al microscopio electrónico las células córneas presentan residuos de perfiles de RER y haces de tonofilamentos; del lado interno de la membrana basal se conservan uniones desmosómicas, y en algunos sitios hay desprendimiento entre las capas. Los espacios subcorneales, especialmente desarrollados, contienen perfiles microvellosidades y material filamentoso a nivel de las antiguas uniones desmosómicas.

Las células de los diferentes estratos de la epidermis tienen los organelos comunes encontrados en el epitelio epidérmico, RER, mitocondrias, ribosomas y haces de tonofilamentos en todas direcciones. Como se señaló anteriormente, el carácter más sobresaliente de las células de los estratos espinoso, granuloso y de reemplazo es la presencia de abundantes gránulos de secreción (Fig. 3). Las membranas celulares son altamente plegadas y unidas en algunos puntos por desmosomas.

El aumento en espesor del estrato esponjoso está determinado especialmente por un incremento en el espacio intersticial más que por un aumento en número de los elementos celulares o fibrosos del tejido conectivo laxo. Los melanóforos situados debajo de la epidermis se obervan contraídos, de modo que no forman una cadena continua como es de común ocurrencia en anuros. No se observó incremento de la vascularización.

En el caso del estrato compacto, la diferencia en grosor se debe a un aumento de haces de fibras colágenas.

Dos tipos de glándulas mucosas son comunes en la epidermis de *Cryptobatrachus boulengeri* (descritas como G1 y G2 en De Pérez y Ruiz-C., 1985); la estructura de cada una de ellas es similar en hembras incubadoras comparada con la de machos y hembras sexualmente adultos; sin embargo, el diámetro de los dos tipos de glándulas, así como la altura de su epitelio secretor es mayor de manera significativa en las hembras incubadoras (t = 7.7, p = 0.001 y t =29.6, p = 0.001 respectivamente para las glándulas G1 y, t = 4.2, p = 0.001 y t = 2.3, p = 0.02, respectivamente para las glándulas G2, Fig. 4). La estructura fina de las células de las glándulas mucosas típicas (G1) en actividad de síntesis o de secreción no presenta variaciones en la composición de organelos.

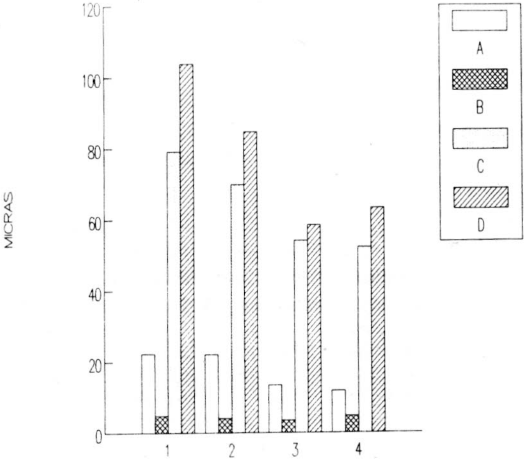
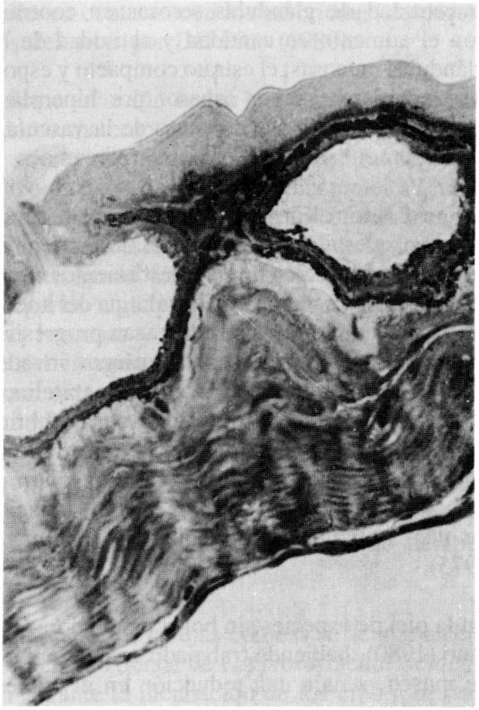
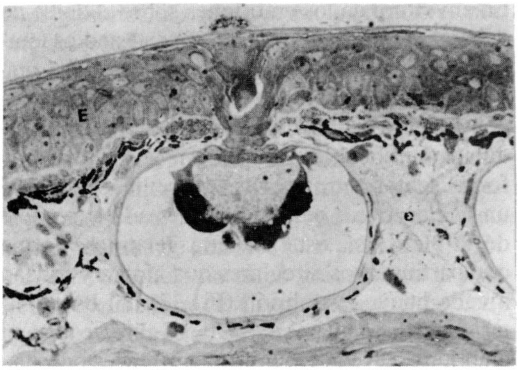
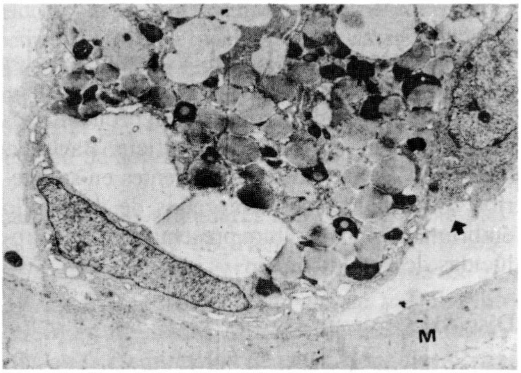


Figura 4. Altura del epitelio secretor y diámetro de las glándulas mucosas G1 y G2 en *Cryptobatrachus boulengeri*. 1. Hembras incubadoras con embriones en estadios tempranos, 2. hembras incubadoras con embriones más avanzados, 3. hembras adultas no incubadoras, 4. machos. A. altura del epitelio secretor en glándulas mucosas, G1, B. altura del epitelio secretor en glándulas G2, C. diámetro de las glándulas G1, D. diámetro de las glándulas G2. Véase en el texto el grado de significancia de las variaciones. Grado de reducción del tamaño original de la figura 40%.

Las glándulas mucosas G2 son de tipo alveolar, con envoltura mioepitelial y epitelio plano; al microscopio de luz, sus células contienen un conjunto de gránulos de secreción PAS y azul de alcian positivo de aspecto espumoso, que al microscopio electrónico aparece como grupos de gránulos de diferente densidad: algunos altamente electrodensos, otros con un área central electrolúcida y material granular fino al interior, y otros gránulos muestran sólo material granular fino, variaciones que interpretamos aquí como estados progresivos de liberación de la secreción para la adhesión de las envolturas embrionarias. En machos y hembras adultos, las glándulas G2 secretan continuamente el producto de secreción y el lumen se encuentra ocupado por ese material (Fig. 5 y 6). En hembras muy próximas a la postura (folículos ováricos de mayor tamaño y oviductos altamente plegados y engrosados) y en hembras incubadoras, el epitelio glandular se desprende junto con la secreción (Figs. 7 y 8).







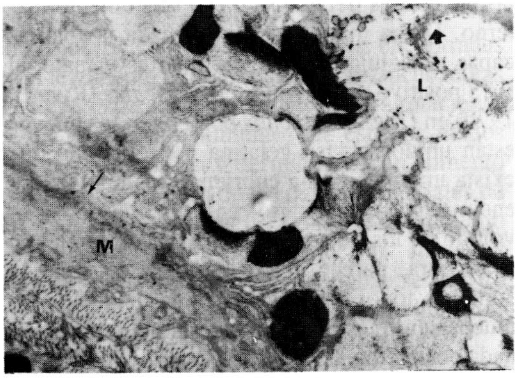


Figura 5. Piel dorsal de macho adulto de *Cryptobatrachus boulengeri.* Se observan dos glándulas G2, una de ellas a nivel del canal expulsando su secreción 400x. **Figura 6.** Vista parcial de una glándula G2 que muestra gránulos de secreción con diferentes electrodensidades. Hacia el lumen glandular (L) se observa parte de la secreción en agregados y finamente granular (flecha ancha), el epitelio plano se encuentra unido (flecha delgada) a la célula mioepitelial (M). 15000x. **Figura 7.** Tegumento de incubación con una glándula G2 en proceso de secreción holocrina. Nótese la amplitud del estrato esponjoso de la dermis (e). Envoltura de los embriones (E). 530x. **Figura 8.** Epitelio secretor de la glándula G2 en una hembra incubadora. Obsérvese el desprendimiento del epitelio (flecha) de la capa mioepitelial (M). 6800x. Grado de reducción del tamaño original de las figuras 56.6%.

La envoltura de los embriones sobre el dorso de la hembra tiene mayor diámetro en estadios tempranos de desarrollo. Esta envoltura tiene una base común para todos los huevos en contacto con la piel de la hembra y fibras circulares onduladas embebidas en ella; en la gelatina que forma septos entre huevos adyacentes se observa un haz de fibras perpendiculares a la superficie de la piel. Así, esta cubierta gelatinosa forma compartimientos circulares que alojan y rodean a cada huevo o embrión (Fig. 2). El borde interno de la matriz en contacto directo con el embrión es delicado y uniformemente festoneado.

La identificación histoquímica de la secreción de las glándulas mucosas de los dos tipos y de la envoltura gelatinosa embrionaria realizada con PAS y azul de alcian demuestra que están constituidas por glucoproteínas ácidas.

Al microscopio electrónico, la envoltura de los embriones es de aspecto granular. Las fibras onduladas embebidas en ella tienen pequeñísimas espínulas a lo largo de su superficie. Bacterias aisladas o en nódulos son frecuentes en su interior. En estados más avanzados de desarrollo embrionario, la envoltura presenta áreas electrolúcidas de disòlución.

Discusión

Dadas las características de la biología reproductiva de los Hemiphractinae, su estudio es de especial interés en las áreas de la fisiología comparada, la embriología y la anatomía para comprender las adaptaciones evolutivas al ambiente terrestre (Del Pino *et al.*, 1975). Las características morfológicas e histológicas del tegumento materno han sido estudiadas en especies de ranas marsupiales y en especies de ranas carentes de bolsa incubadora por Del Pino (1980). Una descripción detallada de la histología de la bolsa incubadora de *Gastrotheca riobambae* se encuentra en Del Pino *et al.* (1975). Jones *et al.* (1973) indujeron con estradiol la formación de la bolsa en esta misma especie, proceso durante el cual se producen una serie de eventos como un adelgazamiento de la epidermis y pérdida de queratina en el epitelio que reviste la cavidad de la bolsa; una discontinuidad de la unidad cromatófora en la dermis, una disminución en la cantidad de glándulas serosas en contraste con el aumento en cantidad y actividad de las glándulas mucosas; el estrato compacto y esponjoso adquieren mayor espesor por hiperplasia del tejido conectivo y aumento de la vascularización en el estrato esponjoso y subcutáneo.

De otro lado, el desarrollo embrionario dentro de la bolsa está acompañado por un incremento en la vascularización de su revestimiento interno en estrecha asociación con la gelatina del huevo; las paredes de la bolsa se adelgazan progresivamente y numerosos vasos sanguíneos invaden el área de la membrana basal del epitelio; a medida que avanza el desarrollo cada embrión en su cápsula queda parcialmente encerrado en un compartimiento vascularizado del tejido de la bolsa, estableciéndose una posible relación de intercambio de gases y agua (Del Pino *et al.*, 1975).

En la piel de especies sin bolsa incubadora, Del Pino (1980), habiendo trabajado con ejemplares de museo, señala una reducción en el número de glándulas venenosas, una mayor vascularización y un aumento en el número y volumen de las glándulas mucosas que serían las responsables de la secreción de la matriz a la que se fijan las envolturas del embrión en el tegumento materno. Dicha matriz estaría formada por varias capas de células epiteliales muertas y material PAS positivo. Como en *Stefania scalae* (Rivero, 1970) en *Cryptobatrachus boulengeri* los huevos están unidos por su gelatina periférica sin que exista una membrana cubriendo los huevos por encima; por el contrario, en la región de la envoltura de los huevos en contacto con la piel de la hembra, parece haber una capa de gelatina común a todos los huevos y una delgada capa mucosa entre ésta y la piel de la hembra, originada posiblemente de las secreciones de las glándulas mucosas maternas. A diferencia de las descripciones de Rivero (1970) y Duellman & Hoogmoed (1984) para especies de *Stefania*, no se observan depresiones pentagonales o hexagonales para cada huevo sobre la piel de las hembras de *Cryptobatrachus boulengeri*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio en *Cryptobatrachus boulengeri* revelan algunas diferencias a nivel histológico de la piel de incubación en contacto con los embriones, respecto a las descritas por Del Pino (1980).

La firme adhesión de los huevos y/o embriones al dorso materno parece darse en primer lugar por el estrecho contacto de la envoltura del conjunto de huevos, de naturaleza glicoproteica ácida, y su penetración dentro de las frecuentes invaginaciones microscópicas de la piel de la hembra, proporcionando un anclaje a los embriones; y en segundo lugar por las secreciones de las glándulas mucosas y en especial por las glándulas G2 del integumento materno, que son de la misma naturaleza química, y que tendrían función adherente.

Las fibras de la envoltura de los huevos dan firmeza al compartimiento de cada embrión y su forma ondulada permite al mismo tiempo flexibilidad.

Varias capas de células córneas se acumulan en el tegumento dorsal de *Cryptobatrachus boulengeri* durante la incubación de los embriones en el dorso y su número podría ser indicativo del tiempo de permanencia de los embriones en el dorso materno como ha sido sugerido para *Minyobates virolinensis* por De Pérez *et al*. (1992).

Las modificaciones más notables encontradas en el tegumento dorsal de las hembras incubadoras de *Cryptobatrachus boulengeri* - invaginaciones de la epidermis, aumento del espesor de los estratos epidérmico y dérmico, y a un aumento en diámetro y altura de las células epiteliales de las glándulas mucosas G1 y G2, al igual que lo observado experimentalmente por Jones *et al.*(1973) en *Gastrotheca riobambae,*serían inducidas por la elevación de los niveles de estrógenos durante la estación reproductiva.

A lo anteriormente expuesto se agrega la hipertrofia de las células epidérmicas, el aumento de los espacios intersticiales del epitelio y del estrato esponjoso, y la acumulación de capas córneas en la superficie epitelial, conjunto de modificaciones que le dan a la piel un carácter esponjoso. A nivel citológico es notable la abundancia de los gránulos PAS positivos dentro de las células de los estratos espinoso y plano de reemplazo. Estos gránulos corresponden a los descritos por Farquhar & Palade (1965) en la capa epitelial de células de reemplazo que son liberados en los espacios intercelulares y entre estas células y las células córneas (Bueno *et al.*, 1981). La naturaleza glicoproteica de estos gránulos, de propiedades hidrofílicas, contribuye a la absorción y transporte de agua fuera del estrato córneo en la epidermis de anfibios (Navas *et al.*, 1985). Así, la frecuencia de estos gránulos en la epidermis incubadora de *Cryptobatrachus boulengeri* estaría correlacionada con el aumento de los espacios intercelulares del epitelio y con el mantenimiento e intercambio hídrico entre el tegumento materno y las envolturas embrionarias.

El mayor espesor del estrato compacto determinado por el aumento de haces de fibras colágenas, ocurre tanto en especies sin bolsa incubadora (Del Pino, 1980) como también en la piel de la bolsa de incubación de *Gastrotheca riobambae* (Jones *et al.*, 1973), y tendría relación con una función de soporte.

Las glándulas granulares son escasas en la piel de las especies de Hemiphractinae (Trueb, 1974). Jones *et al.* (1973) y Del Pino *et al.* (1975) en *Gastrotheca riobambae* y Del Pino (1980) en diferentes especies de la subfamilia, señalan la disminución de estas glándulas como una modificación del tegumento durante la incubación; sin embargo, en la especie aquí estudiada éstas glándulas son tan escasas en hembras incubadoras como en machos y hembras adultos y no constituye una especialización en el tegumento para la incubación. Las glándulas mucosas G1 y G2 tienen un diámetro y altura epitelial mayor que en las ranas no incubadoras y muestran una actividad de síntesis y liberación de la secreción más intensa. El tipo de secreción de las glándulas G2 durante la incubación es holocrina. Así, la secreción de ambos tipos de glándulas mucosas constituye el aporte materno para la adhesión de la envoltura del conjunto de los huevos al tegumento materno.

Agradecimientos

La realización del presente trabajo fue posible por el aporte financiero de la Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, CINDEC, la Facultad de Ciencias, y COLCIENCIAS a Fauna de Colombia (parte) al proyecto "Estudio morfológico, ultraestructural e histoquímico del tegumento de especies de Anura (Amphibia) en relación con el proceso de la reproducción", y la colaboración del Centro de Microscopía, el Instituto de Ciencias Naturales y el Departamento de Biología; los profesores Cristina Ardila y Virginia Montes coleccionaron parte del material.

Literatura citada

Bueno, Ch., P. Navas, J. Aijon & J.L. Lopez-Campos. 1981. Glycoconjugates in the epidermis of *Pleurodeles waltlii. J. Ultrastruct. Res.* 77: 354-359.

De Pérez, G. & P. Ruiz-C. 1985. Ultraestructura e histoquímica de dos tipos de glándulas mucosas de la piel de *Cryptobatrachus* (Amphibia, Anura). *Caldasia* 14(67): 251-264.

—— P.M. Ruiz-C. & M.P. R amírez-P. 1992. Modificaciones tegumentarias de larvas y adultos durante el cuidado parental en *Minyobates virolinensis* (Amphibia: Anura: Dendrobatidae). *Caldasia.* (en este número)

Del Pino, E.M. 1980 Morphology of the pouch and incubatory integument in marsupial frogs. *Copeia* 1980 (1): 10-17.

——.1989. Marsupial frogs. Spektrum der Wissenschaft, 19-28.

——,M.L. Galarza, C.M. De Albuja & A.A. Humphries, JR.1975. The maternal pouch and development in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae* (Fowler). *Biol. Bull.* 149: 480-491.

Duellman, W. 1985. Reproductive modes in anuran amphibians: phylogenetic significance of adaptive strategies. *South Afr. J. Sci.* 81: 174-178.

——.& S.J. Maness. 1980. The reproductive behavior of some hylid marsupial frogs. *J. Herpetol.* 14(3): 213-222.

——.& P. Gray. 1983. Developmental biology and systematics of the egg-brooding hylid frogs, genera *Flectonotus* and *Fritziana. Hepertologica* 39(4): 333-359.

——.& M. Hoogmoed. 1984. The taxonomy and phylogenetic relationships of the Hylid frog genus *Stefania. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ.* 75: 1-39.

Farquhar, M. G. & G. E. Palade. 1965. Cell junctions in amphibian skin. *J. Cell Biol.* 26: 236-291.

Jones, R.E., A.M. Gerrard & J.J. Roth. 1973. Estrogen and brood pouch formation in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae. J. Exp. Zool.* 184: 177-184.

Navas, P., J. M. Villalba & G. Garcia-Herdugo. 1985. Carbohydrate cytochemistry on the cell surface coat of Amphibian keratinocytes during differentiation. *Z. mikrosk. anat. Forsch., Leipzig* 99(3): 447-454.

Rivero, J.A. 1970. On the origin, endemism and distribution of the genus *Stefania* Rivero (Amphibia, Salientia) with the description of a new species from southeastern Venezuela. *Bol. Soc. Venezolana Cien. Nat.* 28: 456-481.

Trueb, L. 1974. Systematic relationships of Neotropical horned frogs, genus *Hemiphractus* (Anura: Hylidae). *Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas* 29: 1-60.